

### **Translation of portions of JP 59-33223**

The invention's agent was obtained by culturing human malignant tumor cells and then subjecting the cultured media to extraction so as to remove the malignant tumor cells therefrom. The agent exhibits specific effects for growth restriction and cytolethality on human tumor cells. This agent for restricting malignant tumor cell proliferation comprises a low-molecular substance, which can pass a filter such as a YM2 or UMO5 filter manufactured by Amicon, adapted for passing a substance having a molecular weight of 1000. Hence, the target substance can be extracted by using such -filter. Although this substances obtained by the extraction show some inhibitory effect on growth of normal cells, their inhibitory effect on the proliferation of malignant cells is remarkably greater. Further, no cytolethal effect against normal cells is observed. Hence, the malignant cell proliferation inhibiting agent of the invention is believed to have hardly any of the side effects found in the conventional anti-tumor agents.

#### **1) cells used in examples**

The examples employed cultured established many kinds of strains of cells separated from human malignant tumor. Namely, the examples employed five types of: the established strain cell HRC derived from human renal cell carcinoma, the established strain cell MK derived from human gastric cancer, the established strain cell PC-1 derived from human lung cancer, the established strain cell KB derived from cancer of floor of mouth of human, the established cell strain HMS derived from human myogenic sarcoma.

## BEST AVAILABLE COPY

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑭ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報 (A)

昭59—33223

⑮ Int. Cl.<sup>3</sup> 識別記号 庁内整理番号  
 A 61 K 35/12 ADU 7138—4C  
 A 61 K 35/23 7138—4C  
 35/34 7138—4C  
 35/36 7138—4C  
 35/37 7138—4C  
 35/38 7138—4C  
 35/42 7138—4C

⑯ 公開 昭和59年(1984)2月23日

発明の数 1  
 審査請求 未請求

(全 12 頁)

⑰ 人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤

⑰ 特 願 昭57—143340

⑰ 出 願 昭57(1982)8月20日

⑰ 発 明 者 田島知行  
市川市八幡6—5—15⑰ 出 願 人 興研株式会社  
東京都千代田区四番町7番地⑰ 出 願 人 大石忠勝  
京都市伏見区中島秋ノ山町55—1⑰ 出 願 人 田島知行  
市川市八幡6—5—15⑰ 出 願 人 長主陽一朗  
大和市中央3丁目9番4号

⑰ 代 理 人 弁理士 竹本松司

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤

## 2. 特許請求の範囲

人の悪性腫瘍細胞の培養液地より前記悪性腫瘍細胞を除いて抽出したものとすることを特徴とする人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤。

## 3. 発明の詳細な説明

この発明は人の悪性腫瘍細胞増殖抑制剤に関する。

この発明は人の悪性腫瘍細胞を培養し、その培養液地より前記悪性腫瘍細胞を除いて抽出したもので、人の腫瘍細胞に対し、増殖抑制や細胞致死効果を特異的に有するものである。この悪性腫瘍細胞増殖抑制剤は、低分子の物質であり、分子量1000の分子を除くアミコン社のY M 2や、UMORなどのフィルターを透過可能であり、これらを用いて抽出することができる。抽出して得られたこの物質は、正常細胞に対しても多少の増殖抑制が認められるが、悪性腫瘍細胞に

対する増殖抑制力とは甚しい差があり、正常細胞に対して致死効果が認められないことから、この発明により得られた悪性腫瘍細胞増殖抑制剤は、従来の抗腫瘍剤のような副作用はほとんどないと考えられる。

また、人の悪性腫瘍細胞に人の正常細胞を混合培養してもその培養液地より抽出したものが同様の効果が得られる。そして、混合培養地の値と新鮮培養地との比率を調べ、正常細胞は増殖し、悪性腫瘍細胞の増殖は弱しく低下させることができる。

次に、この発明の効果を検証するために実験方法について述べる。

## 実 験 1

## 1) 実験材料とした細胞

人の悪性腫瘍より分離した多細胞の培養樹立細胞株を使用した。すなわち、ヒト腎臓癌由来樹立細胞株HRC、ヒト胃癌由来樹立細胞株MK、ヒト肺癌由来樹立細胞株PC-1、ヒト口腔癌由来樹立細胞株KB、およびヒト膀胱癌由来

樹立株細胞はMSの5倍用を製用した。

## 2) 培 養

成長用培地には10%牛新生児血清を添加したBasal Medium Eagle (BME) および5%牛新生児血清を添加したRPMI 1640を成長用培地 (growth medium) として用い、抽出用の培地としては、血清無添加のBMEを使用した。

まず成長用培地を用い、培養時に飽和状態になるまで悪性腫瘍細胞を増殖し、その後1回洗って血清を除く、次に、これを抽出用培地にてそのまま3~4日間37℃にて培養するか、または通常の継代培養の如く、前記培養細胞のうちから既知の細胞数を新たに抽出用培地に播き込んで3~4日間37℃にて培養し、その培地を採取する。

## 3) 成分精製

採取した培地を1,0000, 1000, 500の分子篩にかけ、抽出液を採取する。

## 4) 悪性腫瘍細胞増殖抑制剤の検定法

検定に使用した細胞は実験材料に用いた5段階の肺癌細胞、および63才の正常人男子肺腺癌皮膚

グルコース、アミノ酸、ビタミン、血清10%を添加した培地を用い、対照群は新鮮培地BMEに実験群と同様の栄養素を添加したものをを用いた。細胞の初期濃度は $1 \times 10^4$  cells とし、第1図の実験では35mmの培養皿を、第2図~第5図の実験では15mmの培養皿を用いた。

第1図の実験はヒト腎臓癌由来樹立株細胞HRCの経日的変化を観たもので、対照群の細胞は増加しているのに比べ、ヒト腎臓癌由来樹立株細胞HRC培養後培地より抽出した物質を含む実験群は、増殖が抑制されていることが明らかに示されている。

第2図Aは正常ヒト2倍体皮膚癌細胞株NAS63の経日的変化を、第2図Bはヒト腎臓癌由来樹立株細胞MKの経日的変化を観たもので、いずれも実験群にはヒト腎臓癌由来樹立株細胞MKの培養後培地より抽出した物質を含む培地を用いている。これらの成長曲線から、正常細胞に比べヒト腎臓癌由来樹立株細胞MKの実験群は、明確に成長抑制効果が表われている。

特開59- 33223 (2)

より採取した正常ヒト2倍体皮膚癌細胞株NAS63を用い、その増殖状況を成長曲線および速度反応曲線に表わして調べた。

## a. 成長曲線

既知の細胞数を培養皿に播き、細胞数の抽出用培地にBME培地と同組成、同量のグルコース、アミノ酸、ビタミンを加え、さらに新鮮な前述の血清を10%添加したものを成長用培地として用い、経日的に細胞数を測定するか、または一定期間培養した後、細胞数を調べる。

## b. 速度反応曲線

培養後培地および新鮮培地を各細胞割合で混合し、成長曲線と両方に各種栄養素を加えて一定期間培養した後、細胞数を調べる。

## 5) 実験結果

第1図~第5図は各細胞の培養後培地における細胞増殖の経日的変化を成長曲線に表わしたものである。いずれの実験においても、実験群は各種悪性腫瘍細胞の培養後培地をアミコンYM5 (M, W, 10%) で限界超過後、栄養型として

第3図は、ヒト肺腺癌由来樹立株細胞PC-1の経日的変化を観たもので、ヒト肺腺癌由来樹立株細胞PC-1の培養後培地より抽出した物質を含む実験群の細胞は減少し、致死効果が認められる。

第4図は、ヒト口腔癌由来樹立株細胞KBの経日的変化を観たもので、ヒト口腔癌由来樹立株細胞KBの培養後培地より抽出した物質を含む実験群の細胞は、一時増加するが、やがて減少する。

第5図は、ヒト膀胱癌肉腫由来樹立株細胞HMSの経日的変化を観たもので、ヒト膀胱癌肉腫由来樹立株細胞HMSの培養後培地より抽出した物質を含む実験群の細胞は減少し、致死効果が認められる。

第6図、第7図は、ヒト腎臓癌由来樹立株細胞HRCの培養後培地と新鮮培地の各種割合における速度反応を観たもので、第6図はヒト腎臓癌由来樹立株細胞HRCの速度反応曲線を、第7図は正常ヒト2倍体皮膚癌細胞株NAS63の速度反応曲線を表わしている。いずれも培養後培地を分子篩100の分子を離れさせる

特開昭59- 33223 (3)

飼であるアミコン社製 Y M 2 により滅菌したものを使用し、既分比は培養液値と新鮮培養との前に対して培養液の値の含まれる割合を示している。これらの図より、培養液値は正常細胞にも増殖抑制反応を示すが悪性腫瘍の一例であるヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 H R C には増殖抑制効果がより強く認められる。

図 1 は、体外培養法による各分子量の分画 (fraction) の増殖抑制効果と比較したもので、正常ヒト 2 倍体皮膚線維芽細胞 N A S G 3 と、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 H R C を用いている。

表中①、②、③はグループの番号を示し、④、⑤の分子量 (M. W. ) 10<sup>3</sup> 以下の分画に特異的にヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 H R C に対して増殖抑制および致死効果を持つものが存在する。ただし、この分画は正常細胞へも影響を与えるが、形態的観察では正常細胞に対する致死効果は認められない。

M E を用い、4 H 4 3 7 ° C にて培養後、培養液を採取する。

### 3) 透析、凍結

採取した培養液をウィスピングチューブ (シロファンでできたチューブで通常の透析に用いるもの) に入れ、外側をポリエチレン・グリコールにて密封し、水分を抽出して濃縮する。その後、10% M 塩酸ナトリウム添加緩衝イオンにて透析を行う。

### 4) 癌細胞増殖抑制剤の検定法

検定に用いる癌細胞は、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 H R C 及び人の口腔癌由来樹立したヒト口腔癌由来樹立株細胞 K B を用いた。採取した培養液及び透析した培養液をシャーレ内の 10% 血清添加新鮮培養液に添加したものを、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 H R C 及びヒト口腔癌由来樹立株細胞 K B の 2 種の癌細胞及び正常ヒト線維芽細胞を培養し、その増殖状況を調べた。

### 5) 実験結果

第 8 図は、10% 新鮮血清添加通常培養液、20

### 図 2

#### 1) 実験材料とした細胞

53才、及び63才の正常人の幼体の胸部皮膚より採取した正常ヒト 2 倍体皮膚線維芽細胞、及びヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 H R C を用いた。

#### 2) 培 養

培養には、10% 牛新生児血清を添加した Basal Medium, Eagle (BME) を用いた。培養条件は、閉鎖系または 5% CO<sub>2</sub>、100% 湿度の大気中で行なう開放系を用い、37°C で培養した。

培養容器は、上記培養液で、まず、人の線維芽細胞を培養する。培養器に細胞が一面すき面なく生えた状態になったとき、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 H R C を 10<sup>7</sup> ~ 2 × 10<sup>7</sup> 個接種する。なお、このとき用いる培養器は、通称 Roux 瓶 (ルービン) といわれるものを使用する。そして、混合培養時には前記 Roux 瓶から抽出した 10% 牛新生児血清を添加し、新しく使用する培養液は、前述の 10% 牛新生児血清添加、または血清無添加の 10

% 新鮮血清添加通常培養液、正常細胞培養液に 10% 血清を添加した培養液、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞培養液の培養液及び混合培養液の各培養液の培養液を使用し、ヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 H R C を培養した時の日数に対する細胞数を示す。細胞増殖抑制及び破壊が認められる。

第 9 図は、第 1 図と同様の各種培養液の培養液を使用し、正常ヒト線維芽細胞を培養したもので、混合培養液培養液においても日数に対する細胞数は増殖傾向を示す。

第 10 図は、混合培養液無血清培養液で行ない、その培養液に 10% 新鮮血清を添加したものと 10% 血清添加通常培養液と H R C 培養液の血清無添加培養液とにヒト腎細胞癌由来樹立株細胞 H R C を培養したもので、この結果より無血清培養液にて混合培養液を行なっても同様の効果が得られることがわかった。したがって、この方法によれば、人の癌細胞増殖抑制剤の抽出が血清の存在に邪魔されずにスムーズに行なうことが可能であることがわか

特開2004-33223(4)

る。

第11図は、混合培養培養地と10%血清添加新鮮通常培養地との和に対する混合培養培養地の各種の百分比率による配合を行なったときのヒト正常細胞芽細胞、及びヒト腎細胞由来樹立細胞HRCの増殖率を示したものである。正常細胞は一部比率では正常細胞培養地より高い増殖率を示し、癌細胞は対数的に増殖率が低下する。

第12図は、第4図と同じ培養地またはHRC培養培養地と10%血清添加通常培養地に対する混合培養培養地またはHRC培養培養地における他の癌細胞であるヒト口腔癌由来樹立細胞KBの増殖率を示したもので、混合培養培養地の方がその配合比率が高くなるほど抑制率も高くなる。したがって混合培養培養地は、癌細胞増殖抑制に寄与しており、この抑制は時間によって遅延されることを表わしている。

第13図は、胎血清培養地にて、混合培養を行なった培養培養地を透析したもの、10%血清添加通常培養地と、HRC培養培養地と、10%血

清添加通常培養地との混合割合に対する5日間のHRCの細胞数の変化を調べたもので、混合培養培養地抽出物を添加した培養地に顕著な癌細胞増殖抑制効果が認められた。

なお、人の癌細胞や癌細胞は様々なものがあり、一般論に限らず、同様の効果が認められる。しかし、正常細胞と癌細胞の配合比率により、効果の変化が認められ、上記実験から、正常細胞700~1000万に対し、癌細胞1000万~2000万を培養するのが好ましいと考えられる。なおのため、第14図、第15図を添付する。

第14図は、10%血清添加通常培養地と混合培養培養地との和に対する混合培養培養地の割合を横軸にとり、混合培養の癌細胞HRCと同様の癌細胞HRCの増殖率をそれぞれ変化させた場合の5日間の癌細胞数を縦軸に示したものであって、癌細胞増殖率が大きいほど、また、混合培養培養地の割合が高いほど癌細胞数が少なくなっている。

第15図は、10%血清通常培養地と混合培養培養地との和に対する混合培養培養地の割合を横軸にと

り、混合培養の癌細胞HRCと異なった癌細胞KBの増殖率をそれぞれ変化させた場合の5日間の癌細胞数を縦軸に示したものであって、癌細胞が増えるものであっても、第14図に示す傾向が見られることを示している。

また培養地の種類は、BMEに限らず、他の培養地を用いてもよい。血清添加も10%に限らず他の濃度、または無血清でもよく、牛新生児血清の他、成人の血清、仔牛、牛胎児、または他の動物のものを使用することでもできる。さらに、培養は癌細胞培養やその他の培養液系を用いてもよく、培養液も様々なもので、適宜選択することは自由である。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、各培養地におけるヒト腎細胞由来樹立細胞HRCの増殖を示す図、第2図は、各培養地における正常ヒト2倍体皮膚線維芽細胞NA563の増殖を示す図、第2図Bは、各培養地におけるヒト腎細胞由来樹立細胞KBの増殖を示す図、第3図は、各培養地におけるヒト肺腺癌由来樹立細胞PC-1の増殖を示す図、第4図は、各培養地におけるヒト口腔癌由来樹立細胞KBの増殖を示す図、第5図は、各培養地におけるヒト胎原性肉腫由来樹立細胞HMSの増殖を示す図、第6図は、ヒト腎細胞由来樹立細胞HRCの培養培養地と新鮮通常培養地の各種配合比率におけるヒト腎細胞由来樹立細胞HRCの増殖率を示す図、第7図は、第8図と同様の各培養地における正常ヒト2倍体皮膚線維芽細胞NA563の増殖率を示す図、第8図は、各培養地における癌細胞の増殖を示す図、第9図は、各培養地における正常細胞の増殖を示す図、第10図は、胎血清培養地における癌細胞の増殖を示す図、第11図は、混合培養培養地と新鮮通常培養地との各種配合比率の培養地における正常細胞及び癌細胞の増殖を示す図、第12図は、混合培養培養地と新鮮通常培養地との各種配合比率の培養地における他の癌細胞の増殖を示す図、第13図は、胎血清培養地にて混合培養培養地の透析液を添加した培養地の癌細胞の増殖を示す図、第14図は、各培養地における癌細胞増殖抑制の増殖を示す図、第15図は、各培養地におけるKB細胞

の増殖を示す図、第5図は、各培養地におけるヒト胎原性肉腫由来樹立細胞HMSの増殖を示す図、第6図は、ヒト腎細胞由来樹立細胞HRCの培養培養地と新鮮通常培養地の各種配合比率におけるヒト腎細胞由来樹立細胞HRCの増殖率を示す図、第7図は、第8図と同様の各培養地における正常ヒト2倍体皮膚線維芽細胞NA563の増殖率を示す図、第8図は、各培養地における癌細胞の増殖を示す図、第9図は、各培養地における正常細胞の増殖を示す図、第10図は、胎血清培養地における癌細胞の増殖を示す図、第11図は、混合培養培養地と新鮮通常培養地との各種配合比率の培養地における正常細胞及び癌細胞の増殖を示す図、第12図は、混合培養培養地と新鮮通常培養地との各種配合比率の培養地における他の癌細胞の増殖を示す図、第13図は、胎血清培養地にて混合培養培養地の透析液を添加した培養地の癌細胞の増殖を示す図、第14図は、各培養地における癌細胞増殖抑制の増殖を示す図、第15図は、各培養地におけるKB細胞

特開特許59- 33223 (5)

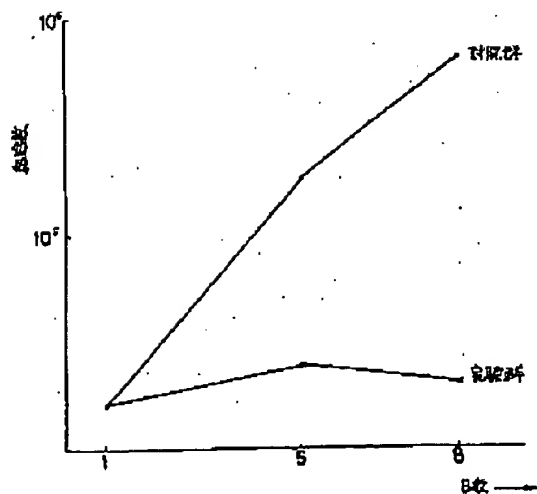
の増殖を示す例である。表1は、各分子重分岐の  
 相対増殖の結果を比較したものである。

出願人代理人 弁護士 竹 本 隆 剛

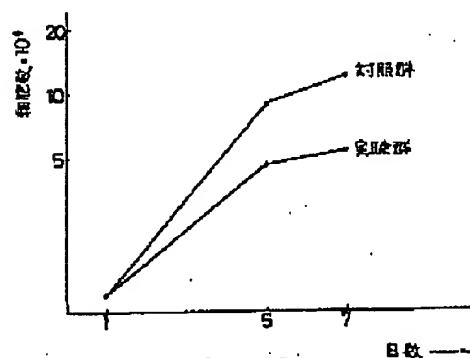
表 1

分 岐	NAS 63		HRS	
	細胞数・10 <sup>4</sup>	%	細胞数・10 <sup>4</sup>	%
対照群	6.30	100	21.14	100
①・10 <sup>4</sup>	1.58	25	0.33	1.6
②・10 <sup>4</sup>	1.72	27	0.31	1.5
10 <sup>4</sup> ・③・10 <sup>4</sup>	3.78	60	17.87	85

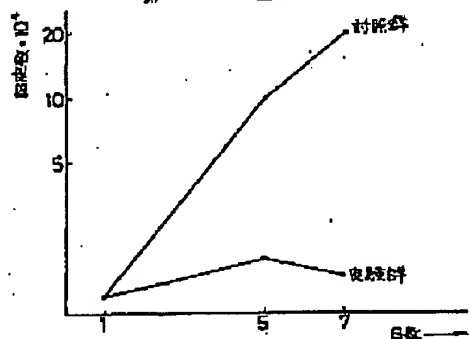
第 1 図



第 2 図 A

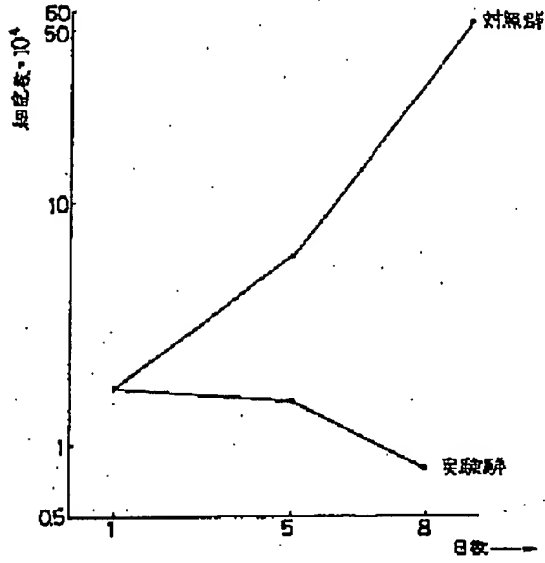


第 2 図 B

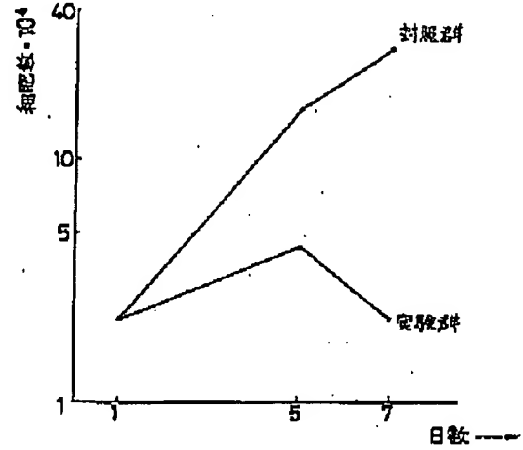


特開昭59- 33223 (6)

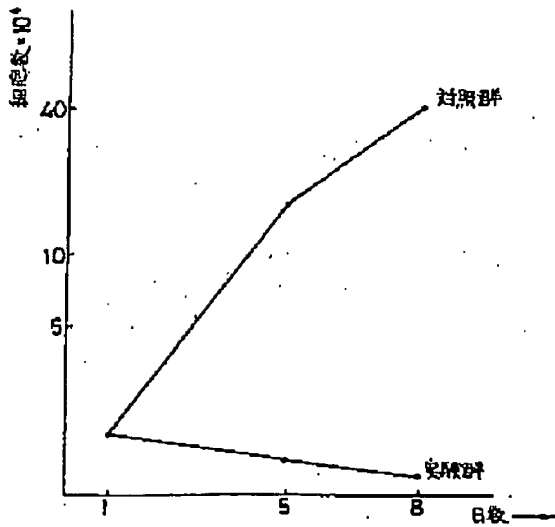
第 3 図



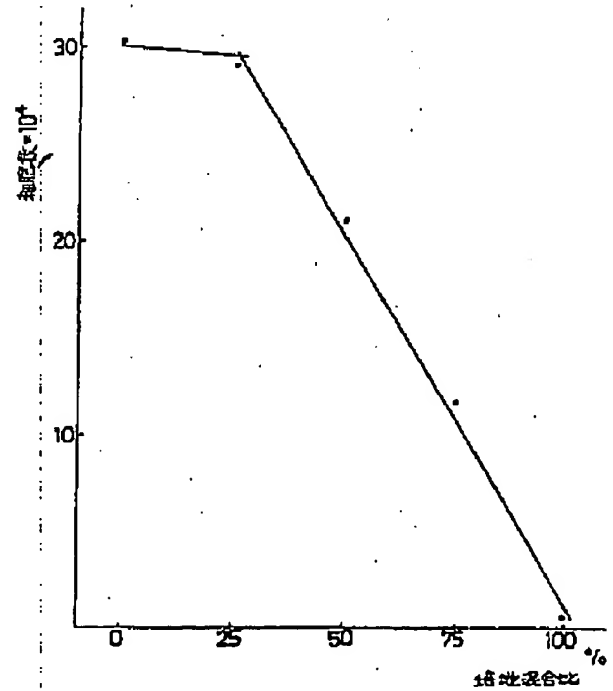
第 4 図



第 5 図

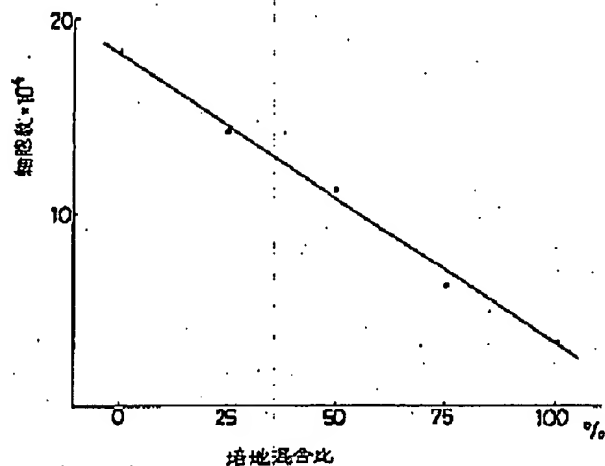


第 6 図



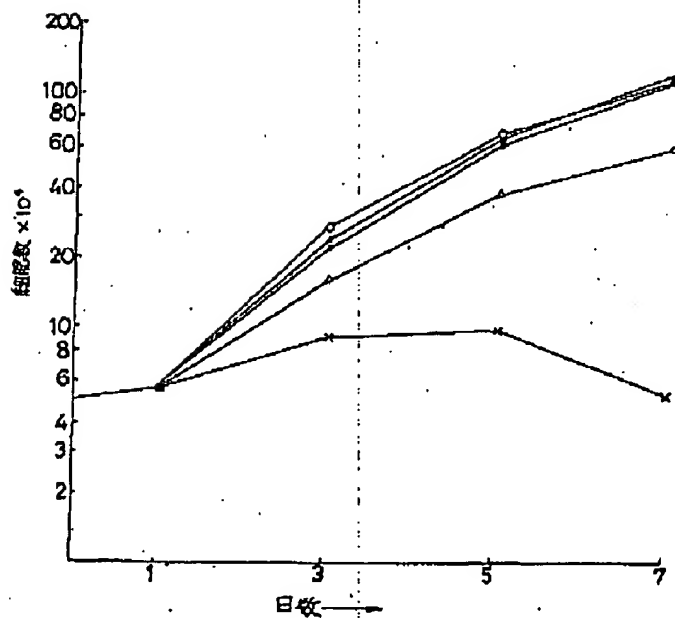
特開特許59- 33223 (7)

第 7 図



第 8 図

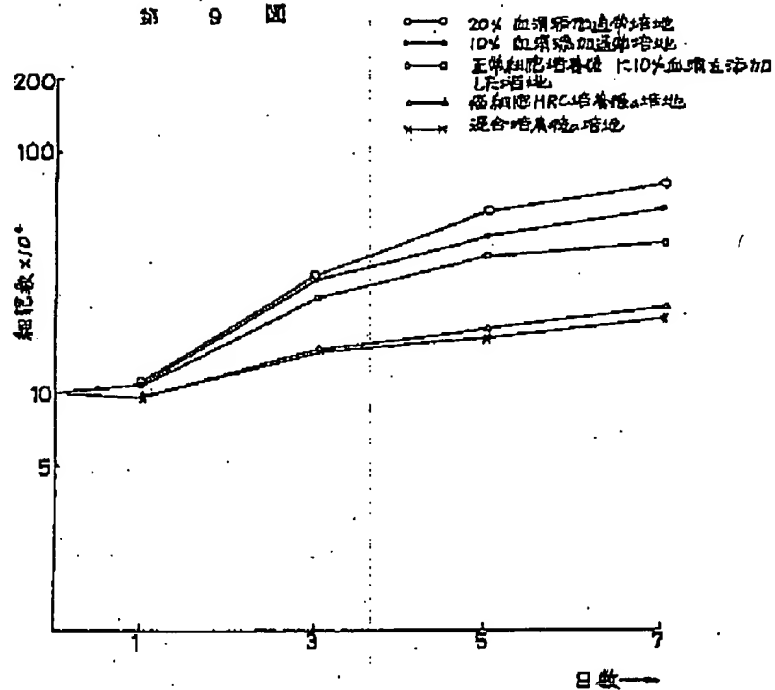
- 10% 血清添加培養液
- 20% 血清添加培養液
- △ 血清添加培養液 1:10
- ◇ 細胞 HRC 培養液
- × 混合培養液



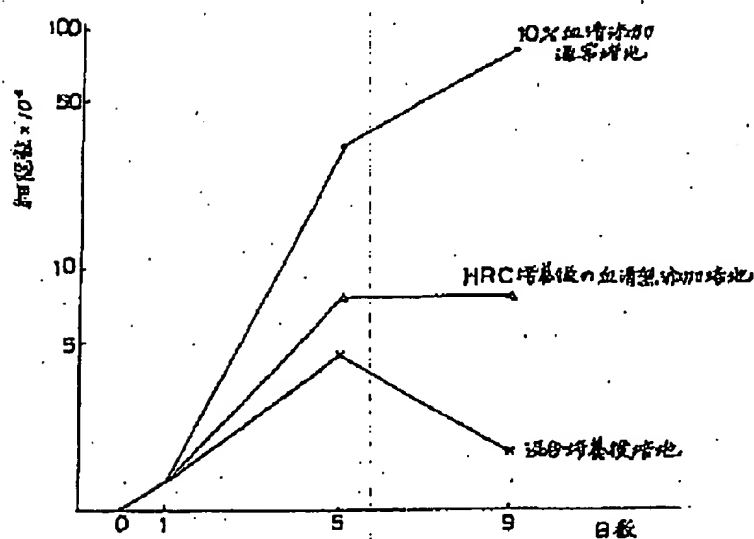


特開昭59- 33223 (B)

第 9 図

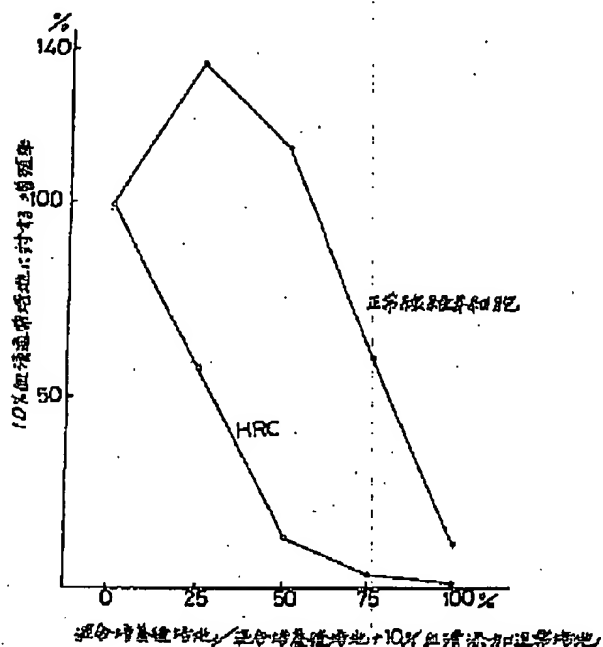


第 10 図

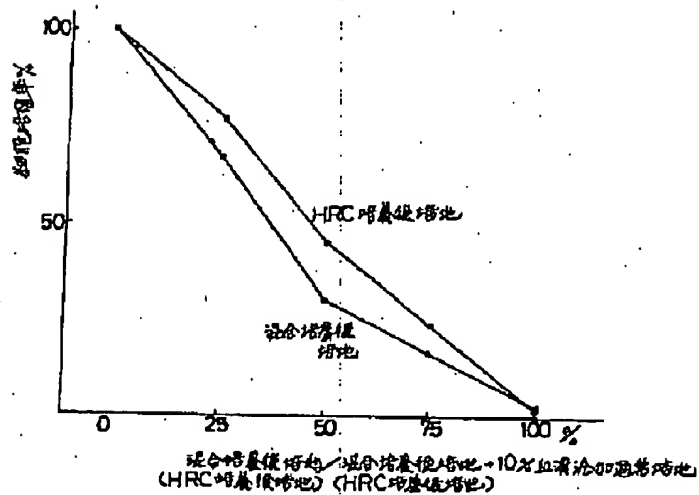


特開昭53- 33223(9)

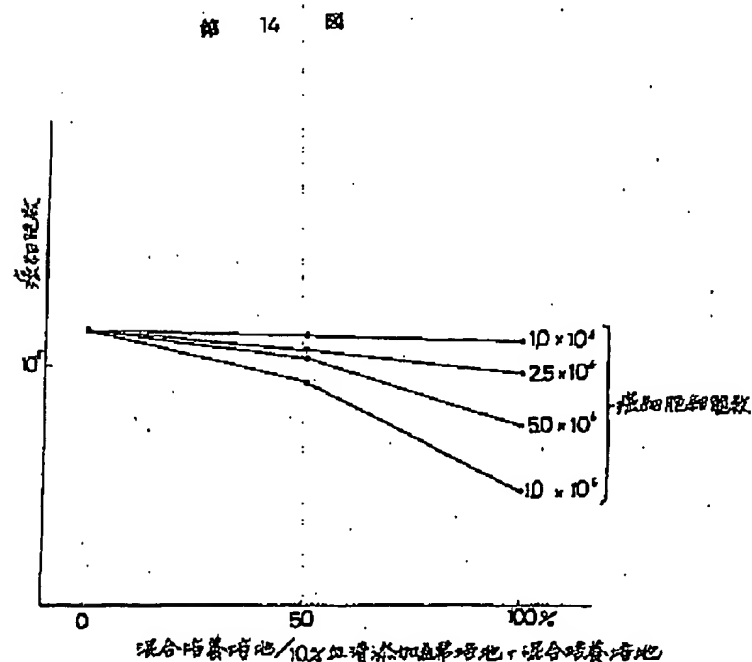
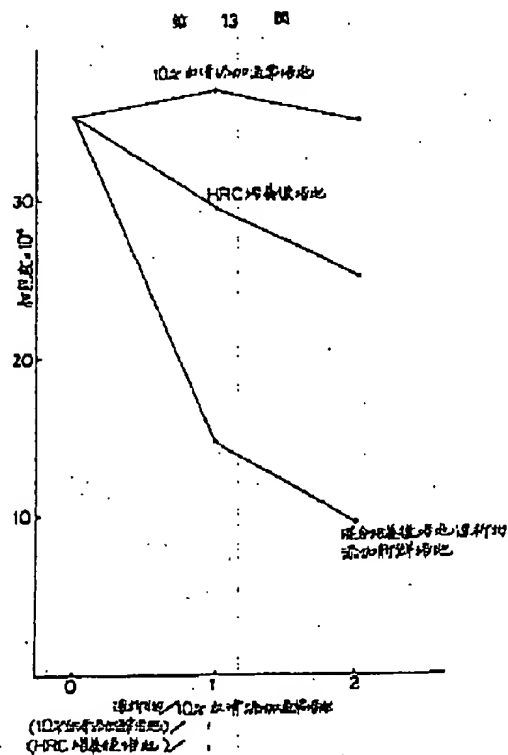
第 11 図



第 12 図

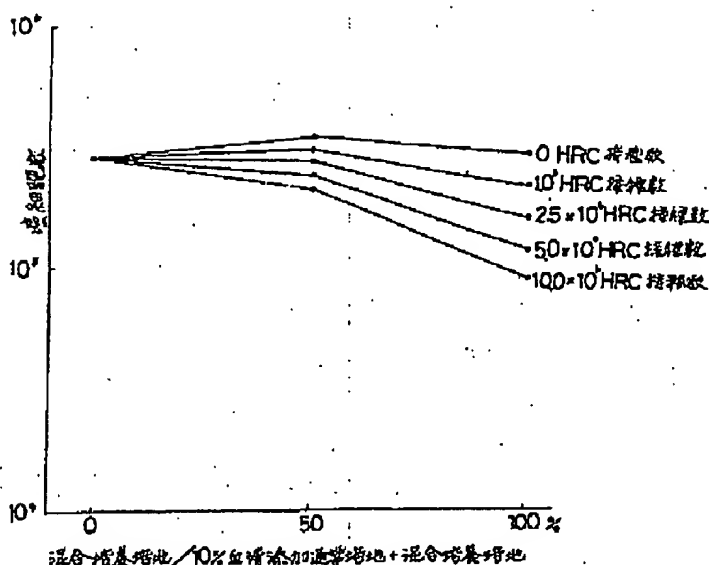


特許第 59-33223 (10)



特開昭59- 33223 (11)

第 15 図



不 能 補 正 出

昭和57年11月29日

特許庁長官 岩 井 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和57年 特 許 第 1 4 3 3 4 ( ) 号

2. 発明の名称

人の遺伝性細胞増殖抑制剤

3. 補正をする者

権利者の国籍 特 許 出 願 人

住所 東京都千代田区西新町7番地

名称 興 産 機 式 会 社

(ほか 3名)

4. 代 理 人 〒 105

住所 東京都港区南青山1丁目1番11号ビル 昭

氏名 (0230) 弁護士 竹 本 敏 司 ( )

電話 502-2576

5. 補正命令の目的 な し (図表補正)

6. 補正により増加する発明の数 な し

7. 補正の対象 申請出の発明請求の範囲の補正及び

発明の範囲を説明の図。

8. 補正の内容

(1) 明細書の特許請求の範囲を列紙のとおり補正する。

(2) 同上第1頁第12行、第2頁第7行、第8行、  
 第9行、第3頁第6行、第6~7行、第8行、  
 第10行、第13行、第14行、第16行、  
 第4頁第8行(2ヶ所)、第8~9行、第12行  
 (2ヶ所)、第16行、第19行、第5頁第2行  
 (2ヶ所)、第17行(2ヶ所)、第6頁第3行、  
 第7行、第11行、第15行(2ヶ所)、  
 第7頁第2行(2ヶ所)、第3行、第4行の「他地」  
 を「他地」と補正する。

(3) 同上第6頁第10行「をを」を「を」に補正す  
 る。

Fulbright (NY) 様 ←S.KITAMURAPATENTOFFICE 06-6375-1620

2004年 9月 28日(木) 10:23 P053

特許明59- 33223 (12)

特許請求の範囲

手 続 補 正 出 (方式)

昭和57年12月 2日

人の遺伝情報に関する情報の提供により遺伝性疾患の発症を抑制して抽出したものであることを特徴とする人の遺伝情報に関する特許。

特許庁長官 杉 村 和 夫 殿

1. 明書の表示

昭和57年 特 許 願 第 143340 号

2. 発明の名称

人の遺伝情報に関する特許

3. 補正をする者

事件との関係 特 許 出 願 人

住所 東京都千代田区四番町7番地

名称 興 隆 株 式 会 社 (ほか 3 名)

4. 代 理 人 〒105

住所 東京都港区虎ノ門1丁目1番11号虎ノ門ビル 0階

氏名 (0230) 弁護士 竹 本 松 司

電話 502-2578

5. 補正命令の日付

昭和57年11月12日(昭和57年11月30日発送)

6. 補正により増加する発明の数 な し

7. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄、図面の欄  
簡単な説明の欄並びに図面中の表1。

8. 補正の内容

(1) 明細書第7頁第18行と第8頁第1行との間に次の表を挿入する。

表 1

分 級	NASB3		HRS	
	細胞数×10 <sup>4</sup>	%	細胞数×10 <sup>4</sup>	%
対照群	6.30	100	21.14	100
0.5×10 <sup>3</sup>	1.58	25	0.33	1.6
0.5×10 <sup>3</sup>	1.72	27	0.31	1.5
10 <sup>3</sup> ×0.5×10 <sup>4</sup>	3.78	60	17.87	85

(2) 同1.第15頁第1行～第2行「表1は、……ものである。」を削除する。

(3) 図面中表1を削除する。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**